

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

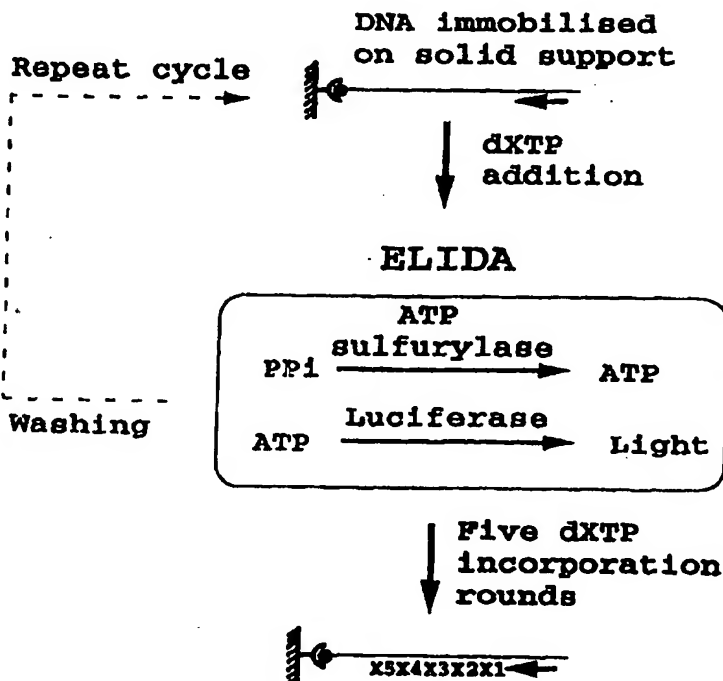
(51) International Patent Classification <sup>6</sup> : <b>C12Q 1/68, 1/66</b>		A1	(11) International Publication Number: <b>WO 98/13523</b>
		(43) International Publication Date: 2 April 1998 (02.04.98)	
(21) International Application Number: <b>PCT/GB97/02631</b>		(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) International Filing Date: 26 September 1997 (26.09.97)		<p><b>Published</b></p> <p><i>With international search report.</i></p> <p><i>Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i></p>	
(30) Priority Data: 9620209.8 27 September 1996 (27.09.96) GB			
(71) Applicant (for all designated States except US): PYROSEQUENCING AB [SE/SE]; Kungsängsvägen 31, S-753 23 Uppsala (SE).			
(71) Applicant (for GB only): DZIEGLEWSKA, Hanna, Eva [GB/GB]; Frank B. Dehn & Co., 179 Queen Victoria Street, London EC4V 4EL (GB).			
(72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): NYREN, Pål [SE/SE]; Riksrådsvägen 67, S-128 39 Skarpnäck (SE). UHLEN, Mathias [SE/SE]; Måsvägen 8B, S-183 57 Täby (SE). RONAGHI, Mostafa [SE/SE]; Lojtnantsgatan 11 6tr, S-115 50 Stockholm (SE).			
(74) Agents: DZIEGLEWSKA, Hanna et al.; Frank B. Dehn & Co., 179 Queen Victoria Street, London EC4V 4EL (GB).			

(54) Title: METHOD OF SEQUENCING DNA

(57) Abstract

The present invention provides a method of identifying a base at a target position in a single-stranded sample DNA sequence wherein an extension primer, which hybridises to the sample DNA immediately adjacent to the target position is provided and the sample DNA and extension primer are subjected to a polymerase reaction in the presence of a deoxynucleotide or dideoxynucleotide whereby the deoxynucleotide or dideoxynucleotide will only become incorporated and release pyrophosphate (PPi) if it is complementary to the base in the target position, any release of PPi being detected enzymically, different deoxynucleotides or dideoxynucleotides being added either to separate aliquots of sample-primer mixture or successively to the same sample-primer mixture and subjected to the polymerase reaction to indicate which deoxynucleotide or dideoxynucleotide is incorporated, characterised in that, the PPi-detection enzyme(s) are included in the polymerase reaction step and in that in place of deoxy- or dideoxy adenosine triphosphate (ATP) a dATP or ddATP analogue is used which is capable of acting as a substrate for a polymerase but incapable of acting as a substrate for a said PPi-detection enzyme.

The method of the invention advantageously permits large-scale non-electrophoretic solid phase DNA sequencing, which allows for continuous determination of the progress of the polymerisation reaction with time.



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号  
特表2001-501092  
(P2001-501092A)

(43) 公表日 平成13年1月30日 (2001.1.30)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	ターミナル* (参考)
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	Z
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 44 頁)

(21) 出願番号 特願平10-515413  
(86) (22) 出願日 平成9年9月26日 (1997.9.26)  
(85) 翻訳文提出日 平成11年3月29日 (1999.3.29)  
(86) 国際出願番号 PCT/GB97/02631  
(87) 国際公開番号 WO98/13523  
(87) 国際公開日 平成10年4月2日 (1998.4.2)  
(31) 優先権主張番号 9620209.8  
(32) 優先日 平成8年9月27日 (1996.9.27)  
(33) 優先権主張国 イギリス (GB)

(71) 出願人 バイロシーケンシング・アーベ  
スウェーデン国、エス-753・23・ウプサ  
ラ、クングサングスヴァーゲン 31  
(72) 発明者 ナイレ、パイ  
スウェーデン国、エス-128・39・スカー  
ブナック、リクスラズヴァーゲン 67  
(72) 発明者 ウーレン、マティアス  
スウェーデン国、エス-183・57・タビー、  
マスヴァーゲン 8 ベー  
(74) 代理人 弁理士 山崎 行造 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNAの配列決定法

(57) 【要約】

本発明は、一本鎖試料DNA配列中の標的位置の塩基を同定する方法であって、標的位置のすぐ隣で試料DNAにハイブリダイズする伸長プライマーを用意し、試料DNAおよび伸長プライマーを、デオキシヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドの存在下でポリメラーゼ反応に供し、それによりデオキシヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドを、それが標的位置の塩基と相補的である場合にのみ、取り込まれてピロホスフェート (PPi) を放出するようにし、PPi放出を酵素的に検出し、異なるデオキシヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドを、試料-プライマー混合物の別個のアリコートに、または同じ試料-プライマー混合物のアリコートに連続的に添加して、ポリメラーゼ反応に供し、どのデオキシヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドが取り込まれたかを示す方法であって、PPi検出酵素がポリメラーゼ反応工程に包含されること、およびデオキシまたはジデオキシアデノシントリホスフェート (ATP) の代わりに、ポリメラーゼの基質として作用することができるが前記PPi検出酵素の基質としては作用す

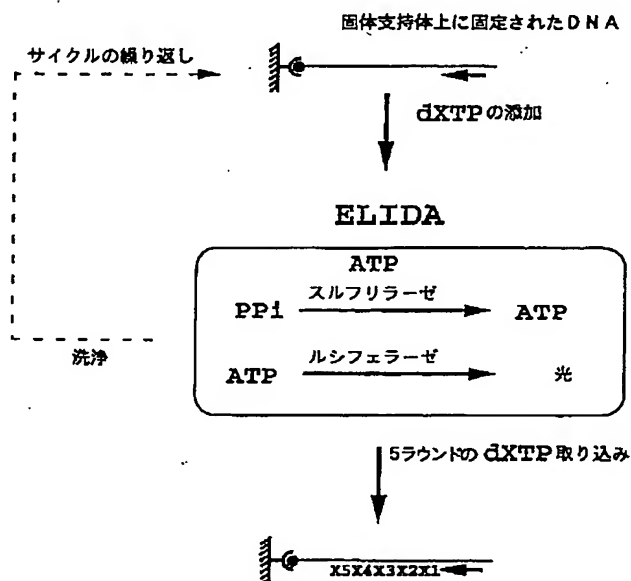


FIG. 1

## 【特許請求の範囲】

1. 一本鎖試料DNA配列中の標的位置の塩基を同定する方法であって、

標的位置にすぐ隣接して試料DNAにハイブリダイズする伸長プライマーを用意し、試料DNAおよび伸長プライマーを、デオキシヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドの存在下でポリメラーゼ反応に供し、

それによりデオキシヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドを、それが標的位置の塩基と相補的である場合にのみ取り込まれてピロホスフェート (PPi) を放出するようにし、PPiの放出を酵素的に検出し、異なるデオキシヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドを、試料-プライマー混合物の別個のアリコートに、または同じ試料-プライマー混合物のアリコートに連続的に、添加して、ポリメラーゼ反応に供し、どのデオキシヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドが取り込まれたかを示す方法であって、

PPi検出酵素がポリメラーゼ反応工程に包含されること、およびデオキシまたはジデオキシアデノシントリホスフェート (ATP) の代わりに、ポリメラーゼの基質としては作用することができるが、前記PPi検出酵素の基質としては作用することができないdATPまたはddATPアナログを用いることを特徴とする方法。

2. PPiの放出を、ルシフェラーゼ-ルシフェリンベースの反応を手段として検出する、請求項1記載の方法。
3. PPiの放出を、酵素的発光計測無機ピロホスフェート検出アッセイ (ELIDA) を用いて検出する、請求項2記載の方法。
4. dATPまたはddATPアナログが、デオキシアデノシン $\alpha$ -チオトリホスフェート (dATPaS) である、請求項1～3のいずれか1項記載の方法。
5. dCTP、dGTPおよびdTTPの $\alpha$ -チオアナログの使用をさらに含む、請求項1～4のいずれか1項記載の方法。
6. 試料DNAを、固定化する、または固体支持体への付着のための手段とともに提供する、請求項1～5のいずれか1項記載の方法。

7. 試料DNAを最初に増幅する、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。
8. 伸長プライマーが、ループを含み、それ自身および試料DNAの3'末端にアニーリングする、請求項1～7のいずれか1項記載の方法。
9. 試料DNAを増幅に供し；増幅されたDNAを固定化し、次に鎖分離に供し、固定化されていない鎖を除去し、標的位置にすぐ隣接して固定化DNAにハイブリダイズする伸長プライマーを用意し；固定化一本鎖DNAの4つのアリコートの各々を、次にジデオキシヌクレオチドの存在下でポリメラーゼ反応に供し、各アリコートには異なるジデオキシヌクレオチドを用いて、それにより標的位置の塩基に相補的なジデオキシヌクレオチドのみが取り込まれるようにし；次に、4つのアリコートを4つすべてのデオキシヌクレオチドの存在下で伸長に供し、それにより各アリコートにおいてジデオキシヌクレオチドと反応していないDNAを伸長させて二本鎖DNAを形成させる一方で、ジデオキシでブロックされたDNAを一本鎖DNAのまま残し；続いて、二本鎖DNAおよび／または一本鎖DNAを同定して、どのジデオキシヌクレオチドが取り込まれたか、したがってどの塩基が標的位置に存在したかを示す、請求項1～8のいずれか1項記載の方法。
10. 請求項1～9のいずれか1項記載の方法において用いるためのキットであって、
  - (a) 標的位置がプライマーの3'末端に直接隣接するように試料DNAにハイブリダイズする試験特異的プライマー；
  - (b) ポリメラーゼ；
  - (c) ピロホスフェート放出を検出するための検出酵素；
  - (d) dATPの代わりに、ポリメラーゼの基質として作用することができるが前記PPi検出酵素の基質として作用することはできないdATPアナログを包含するデオキシヌクレオチド；および
  - (e) 場合により、ジデオキシヌクレオチド（場合により、ddATPがポリメラーゼの基質として作用することができるが前記PPi検出酵素の基質として作用することができないddATPアナログで置換されていてもよい）

を含むキット。

11. 請求項10記載のキットであって、最初のPCR増幅について用いるために、さらに

(i) 少なくとも1つのプライマーがプライマーの固定化を可能にする手段を有する1対のPCRプライマー；

(ii) PCR用ポリメラーゼ；および

(iii) デオキシヌクレオチド

を含むキット。

12. ポリメラーゼ反応工程中のポリメラーゼが、エキソヌクレアーゼ欠損性（exo<sup>-</sup>）である、請求項1～11のいずれか1項記載の方法またはキット。

13. 複数の試料DNA配列についての使用のための、前記DNA配列を固体表面にアッセイフォーマットで配置する、請求項1～12のいずれか1項記載の方法またはキット。

## 【発明の詳細な説明】

## DNAの配列決定法

本発明は、ピロホスフェート (PPi) の放出による塩基の取り込みの検出に基づくDNAの配列決定法に関する。特に、本発明は、「リアルタイム」配列決定法に関する。

DNA配列決定 (シーケンシング) は、分子遺伝学的分析において必須の道具である。DNAヌクレオチド配列を決定する能力は、ヒトおよび他の高等生物の大きなゲノムの配列の決定するための努力が開始されたので、ますます重要になってきている。DNA配列決定の2つの最も一般的に用いられる方法は、サンガー (Sanger) の酵素的鎖停止法、およびマキシムおよびギルバート (Maxam and Gilbert) の化学的切断技術である。両方法とも、より大きなDNAフラグメントから生成されたDNAフラグメントを、そのサイズにしたがって解像するために、ゲル電気泳動に依存している。電気泳動の工程は、その後の分離されたDNAフラグメントの検出とともに、手間のかかる手順であるので、これらの工程を自動化するために多大な努力がなされてきた。しかし、自動化された電気泳動ユニットが商業的に利用可能であるという事実にもかかわらず、電気泳動は、高性能のスループットを有する比較的費用に対する効果のよいユニットが必要とされる大規模ゲノムプロジェクトまたは臨床的配列決定には十分に適していない。したがって、電気泳動によらない配列決定法に対する必要性は大きく、電気泳動の欠点を克服するためのいくつかの代替的な戦略、例えばスキャニング・トンネル電子顕微鏡術 (Driscoll et al., 1990, Nature, 346, 294-296)、ハイブリダイゼーションによる配列決定法 (Bainset al., 1988, J. Theo. Biol. 135, 308-307) および単一分子検出法 (Jeff et al., 1989, Biomol. Struct. Dynamics, 7, 301-306) が記載されてきた。

単一のDNA塩基の変化の迅速な検出を可能にする技術もまた、遺伝的解析のための重要な道具である。多くの場合、単一塩基または少数塩基の検出は、遺伝的解析において非常な助けとなる。これは、いくつかの遺伝的疾患およびある種

のガンは微少な突然変異に関連しているためである。固相原理に基づくミニ配列

決定プロトコールが記載されていた (Hultman et al., 1988, Nucl. Acids Res., 17, 4937-4946; Syvanen et al., 1990, Genomics, 8, 684-692)。放射性標識ヌクレオチドの取り込みを測定し、ヒトアポリポタンパクE遺伝子の3対立遺伝子多型の解析に用いた。しかし、放射活性法は、ルーチンの臨床的適用には十分に適さず、それゆえ、迅速なDNA配列決定解析のための簡便な非放射活性法も興味を持たれてきた。

ポリメラーゼ反応中に放出される無機ピロホスフェート (PPi) を検出するコンセプトに基づく配列決定の方法は、記載されていた (WO 93/23564 および WO 89/09283)。ポリメラーゼ反応中に伸長する核酸鎖に各ヌクレオチドが付加されるにしたがって、ピロホスフェート分子が放出される。これらの条件下で放出されるピロホスフェートは、酵素的に、例えばルシフェラーゼ-ルシフェリン反応において光を生成することにより、検出することができることを見出された。このような方法は、電気泳動の必要性および有害な放射性標識の使用を回避しながら、塩基が標的位置で同定され、DNAが簡便に迅速に配列決定されることを可能にする。

しかし、上述のPPiベースの配列決定方法は、欠点がないものではない。まず最初に、配列決定反応（鎖伸長）において用いられるdATPは、ルシフェラーゼ酵素の基質として作用することにより、その後のルシフェラーゼベースの検出反応に干渉することが見出されている。多くの場合に、この干渉は、この方法の利用性を著しく制限する。

第二に、上述のPPiベースの方法は、操作の容易さおよび速さにおいて改良を示す一方で、配列情報の迅速な検出および提供を可能にする改良された配列決定法の需要がなお存在する。特に、配列決定・鎖伸長反応と同時に、またはその直後に配列情報が解明されることを可能にする「リアルタイム」の配列決定法の需要が存在する。

本発明者らは、これらの問題が検討され、配列決定反応が連続的にモニターされることを可能にした、各ヌクレオチドが取り込まれるにしたがってシグナルが生成され、検出される、新規な改変されたPPiベースの配列決定法を提案する。

これは、dATPの代わりに、ルシフェラーゼ反応に干渉しないdATPアナログを用いることにより、そして、鎖伸長反応混合物中に「検出酵素」を包含させることによって鎖伸長と検出（またはシグナル生成）反応とを実質的に同時に行うことにより達成される。これは、まず鎖伸長反応を第一の反応工程として分離して行い、続いて別個の「検出」工程を行い、ここで鎖伸長反応の生成物を続いてルシフェリン-ルシフェラーゼベースのシグナル生成（「検出」）反応に供する、という上記で提案されたPPiベースの配列決定法に報告されたアプローチからの逸脱を表す。

したがって、1つの側面においては、本発明は、一本鎖試料DNA配列中の標的位置の塩基を同定する方法であって、

標的位置にすぐ隣接して試料DNAにハイブリダイズする伸長プライマーを用意し、試料DNAおよび伸長プライマーを、デオキシヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドの存在下でポリメラーゼ反応に供し、

それによりデオキシヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドを、それが標的位置の塩基と相補的である場合には取り込まれて、ピロホスフェート（PPi）を放出するようにし、PPiの放出を酵素的に検出し、異なるデオキシヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドを、試料-プライマー混合物の別個のアリコートに、または同じ試料-プライマー混合物に連続的に添加して、ポリメラーゼ反応に供し、どのデオキシヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドが取り込まれたかを示す方法であって、

PPi検出酵素がポリメラーゼ反応工程に包含されること、およびデオキシまたはジデオキシアデノシントリホスフェート（ATP）の代わりに、ポリメラーゼの基質として作用することができるが、前記PPi検出酵素の基質としては作用することができないdATPまたはddATPアナログを用いること、を特徴とする方法、を提供する。

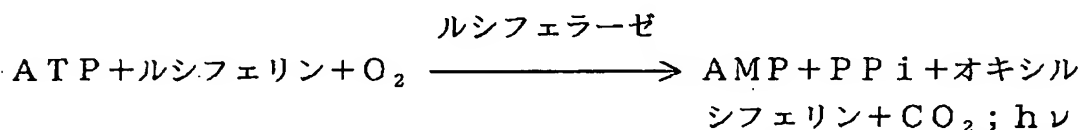
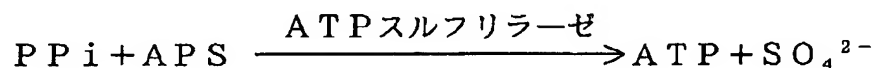
本明細書で用いる場合、「ジデオキシヌクレオチド」という用語は、3'-ヒドロキシル基が欠如し、または改変されており、したがってポリメラーゼの存在下でプライマーに付加されることはできるが、その後の重合反応に入ることはできないすべての2'-デオキシヌクレオチドを包含する。



PPiは、多くの異なる方法によって決定することができ、多数の酵素的方法が文献に記載されている (Reeves et al., (1969), Anal. Biochem., 28, 282-287; Guillery et al., (1971), Anal. Biochem., 39, 170-180; Johnson et al., (1968), Anal. Biochem., 15, 273; Cook et al., (1978), Anal. Biochem. 91, 557-565; および Drake et al., (1979), Anal. Biochem. 94, 117-120)。

ピロホスフェートの放出を同定するために、ルシフェラーゼおよびルシフェリンを組み合わせで用いることが好ましい。これは、生成される光の量は、放出されたピロホスフェートの量に実質的に比例し、放出されたピロホスフェートの量は、取り込まれた塩基の量に正比例するためである。光の量は、ルミノメーターのような好適な光感受性装置により容易に概算することができる。

PPiの放出を検出するためのルシフェリン-ルシフェラーゼ反応は、当業界で周知である。特に、酵素ATPスルフリラーゼおよびルシフェラーゼに基づいてPPi放出を連続的にモニタリングする方法は、NyrenおよびLundin (Anal. Biochem., 151, 504-509, 1985)により開発されており、ELIDA (Enzymatic Luminometric Inorganic Pyrophosphate Detection Assay; 酵素的ルミノメトリック無機ピロホスフェート検出アッセイ) と呼ばれる。PPiを検出するためのELIDA法の使用は、本発明によれば、好ましい。しかし、この方法は、例えばより温度安定性の高いルシフェラーゼ (Kahyama et al., 1994, Biosci. Biotech. Biochem. 58, 1170-1171)の使用により、改変してもよい。この方法は、以下の反応に基づいている：



(APS = アデノシン5'-ホスホスフェート)

したがって、PPi検出反応に関与する好ましい検出酵素は、ATPスルフリ

ラーゼおよびルシフェラーゼである。

本発明の方法を実行するためには、検出酵素をポリメラーゼ反応工程、すなわち鎖伸長反応工程に包含させる。したがって、検出酵素は、ポリメラーゼ反応の前に、それと同時に、またはその最中に、ポリメラーゼ工程のための反応混合物に添加する。ELIDA検出反応の場合には、ポリメラーゼ反応のための反応混合物は、少なくとも1つのヌクレオチド（デオキシまたはジデオキシ）、ポリメラーゼ、ルシフェリン、APS、ATPスルフリラーゼおよびルシフェラーゼを含有していてもよい。ポリメラーゼ反応は、ポリメラーゼの添加、またはより好ましくはヌクレオチドの添加により開始させてもよく、好ましくは、検出酵素は、反応が開始する時には既に存在するか、それらを反応を開始させる試薬とともに添加してもよい。

したがって、本発明は、ポリメラーゼ反応中にPPi放出が検出されることを可能にし、リアルタイムのシグナルを与える。配列決定反応は、リアルタイムで連続的にモニタリングしてもよい。したがって、PPi放出の迅速な検出のための手順が本発明により可能になる。ELIDA反応は、2秒未満で起こると概算されている（Nyren and Lundin、前出）。律速工程は、ATPスルフリラーゼによるPPiのATPへの変換であり、一方、ルシフェラーゼ反応は素早く、0.2秒未満で起こると概算されている。ポリメラーゼについての取り込み率もまた、種々の方法で概算されており、例えばKlenow（クレノウ）ポリメラーゼの場合には、1つの塩基の完全な取り込みが0.5秒未満で起こりうることが見出されている。したがって、ELIDAによる1つの塩基の取り込みおよび検出のための概算の総時間は、およそ3秒である。したがって、非常に早い反応時間が可能であり、リアルタイムの検出が可能になることがわかるであろう。反応時間は、より温度安定性の高いルシフェラーゼを用いることにより、さらに短縮しうる。

本発明のさらなる特徴は、酵素的PPi検出反応に干渉しないが、それにもかかわらずポリメラーゼにより伸長するDNA鎖に正常に取り込まれうる、dATPまたはddATPアナログの使用である。「正常に取り込まれる」とは、ヌクレオチドは正常な正しい塩基対を形成して取り込まれることを意味する。ルシ

フェラーゼがPPi検出酵素である本発明の好ましい態様においては、本発明に

したがって用いるための好ましいアナログは、デオキシまたはジデオキシATPの〔1-チオ〕トリホスフェート（または $\alpha$ -チオトリホスフェート）アナログ、好ましくはデオキシアデノシン〔1-チオ〕トリホスフェート、またはこれも公知のデオキシアデノシン $\alpha$ -チオトリホスフェート（dATP $\alpha$ S）である。dATP $\alpha$ Sは、dCTP、dGTPおよびdTTPの $\alpha$ -チオアナログとともに、New England Nuclear Labsから購入することができる。以下の実施例において記載するように、実験は、dATPをdATP $\alpha$ Sで置換することは、dATP $\alpha$ Sとルシフェラーゼとの間での相互作用の欠如のため、低いバックグラウンドシグナルでのポリメラーゼによる効率的な取り込みを可能にすることを示した。シグナル対ノイズ比は、dATPの代わりにヌクレオチドアナログを用いることにより、それがルシフェラーゼの基質として機能することができるdATPの能力により引き起こされるバックグラウンドを排除するため、本発明にしたがえば増大する。特に、本発明者らは、dATPによる干渉に起因するルシフェリン-ルシフェラーゼ系による光の生成によるバックグラウンドシグナルが実質的に減少する一方で、ポリメラーゼを用いての効率的な取り込みが達成されることを見出した。

鎖伸長の間またはその後、例えば不純物としてまたは取り込ませるべき塩基の供給源として添加したdATPの夾雑物として、反応混合物中にATPが存在する場合には、これもピロホスフェートルシフェリン系に干渉し、不正な発光の読み取りを与える。したがって、反応混合物に加える前に試薬溶液からATPを除去することが有利である可能性がある。これは、もはやルシフェラーゼの基質ではない生成物にATPを変換させる固定化酵素と溶液とを接触させることにより、達成することができる。このような酵素としては、特に、ATPをAMPおよび2個のホスフェート分子に変換するアピラーゼ（apyrase）が挙げられる。次に、この固定化酵素を、鎖伸長／検出の前に除去してもよい。固体支持体としてDynabeads（登録商標）（ノルウェイ、オスロのDynal ASにより販売）のような磁性ビーズを用いることが特に好都合である。これは、このようなビーズは、磁石を用いて溶液との接触から容易に除去できるためである。しかし、一般

に、このようなATP除去工程は、本発明にしたがえば必要であるとは見出されていない。

本発明の方法をサイクルとして繰り返し、それによって試料DNAを配列決定するために、また、一本鎖試料DNAをその相補鎖から分離するのを助けるために、試料DNAを、固定化するか、または固体支持体への付着のための手段とともに提供することが望ましい。さらに、利用可能な試料DNAの量は少量である可能性があり、したがって、本発明の方法を実行する前に試料DNAを増幅することが望ましいことがある。

試料DNAは、例えばインビトロでPCRまたはSelf Sustained Sequence Replication (3SR) により、あるいはインビボでベクターを用いて、増幅することができ、そして望ましい場合にはインビトロおよびインビボ増幅を組み合わせ用いてもよい。いずれの増幅方法を用いる場合であっても、増幅されたDNAは、固定化するか、または固体支持体への付着手段とともに提供することが望ましい。例えば、PCRプライマーを固定化してもよく、または固体支持体への付着手段とともに提供してもよい。また、ベクターは、増幅された試料DNAおよび付着手段と一緒に切り出されうるように、試料DNAの挿入部位の隣に固体支持体への付着手段を含んでいてもよい。

増幅されたDNAの固定化は、1または2以上のプライマーを支持体に付着させる場として、PCR増幅反応それ自身の一部として起こってもよく、あるいは1または2以上のPCRプライマーがその後の固定化を可能にする官能基、例えばビオチンまたはチオール基を有していてもよい。プライマーの5'末端による固定化は、DNAの鎖が固体支持体に付着すべきプライマーから発し、その3'末端が支持体から離れてその後の伸長プライマーとのハイブリダイゼーションおよびポリメラーゼによる鎖伸長に利用可能であることを可能にする。

固体支持体は、好都合にはマイクロタイターウェルの形態をとってもよく、これは、有利には8×12の従来のフォーマット、またはプライマーDNAを結合するように活性化されるポリスチレン製であってもよい計量棒（ディップスティック）の形態であってもよい（K. Almer, 博士論文, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden, 1988）。しかし、当業界で記載されている非

常に多数のいずれのものをも含め、任意の固体支持体を好都合に用いることができ、例えば分離／固定化反応または固相アッセイ用のものがある。したがって、支持体は、例えば、アガロース、セルロース、アルギネート、テフロン（商標）またはポリスチレン製の、粒子、繊維またはキャピラリ（毛細管）をも含んでいてよい。磁性粒子、例えばDynal AS (Oslo, Norway) によって生産される超常磁性ビーズは、反応混合物から容易に単離することができ、しかも多くの他の形態の支持体よりも優れた反応動態を有するので、好ましい支持体である。

固体支持体は、プライマーの付着のために、ヒドロキシル、カルボキシル、アルデヒドまたはアミノ基のような官能基、あるいは他の部分（アビジンまたはストレプトアビジン等）を担持していてもよい。これらは、一般に、このような官能基の1つを担持するポリマーの表面コーティングを提供するために支持体を処理することにより提供してもよい。例えば、ポリグリコールとともにポリウレタンを用いてヒドロキシル基を提供し、またはセルロース誘導体によりヒドロキシル官能基、アクリル酸またはメタクリル酸のポリマーまたはコポリマーによりカルボキシル基、またはアミノアルキル化ポリマーによりアミノ基を提供してもよい。米国特許第4654267号には、多くのこのような表面コーティングの導入が記載されている。

アッセイ技術は、非常に簡便で迅速であり、したがって多量の試料を迅速に解析する可能性がある場合にはロボット装置を用いることによって自動化することが容易となる。好ましい検出および定量は発光計測反応に基づいているので、これは、分光光度分析的に容易に行うことができる。ルミノメーターの使用は、当業界で周知であり、文献に記載されている。

したがって、本発明のリアルタイムのピロホスフェート検出法は、大規模な、電気泳動によらない、固相配列決定手順のための自動化アプローチの可能性を拓くものであり、これは、時間とともに重合反応の進行を連続的に計測することを可能にする。また、本発明の方法は、複数の試料を並行して取り扱うことができるという利点も有する。

標的DNAは、試料中のRNAから合成されたcDNAであってもよく、したがって、本発明の方法は、特徴的なRNAに基づく診断に適用可能である。この

ような予備的合成は、逆転写酵素を用いる予備的处理により、好都合には用いる場合その後のPCR工程の緩衝液および塩基類と同じ系において、実行することができる。PCR手順は、鎖の分離を行うために加熱を必要とするので、逆転写酵素は最初のPCRサイクルで不活性化されることになる。mRNAが試料核酸である場合、すべてのmRNAをその末端のポリA配列を介して取り出すために、最初の試料、例えば血清試料を、固定化ポリdTオリゴヌクレオチドでの処理に供することが有利である可能性がある。あるいは、特異的オリゴヌクレオチド配列を用いて、そのRNAを、特異的RNA配列を介して取り出してもよい。オリゴヌクレオチドは、次に、WO89/0982に記載されているようにcDNA合成のプライマーとして役立てることができる。

有利には、伸長プライマーは、標的位置のすぐ5'側の配列との適切なハイブリダイゼーションを提供するのに十分に長いものであり、なおかつ不要な化学合成を避けるために妥当に短いものである。C-Gペアリング（対合）においてより多い水素結合が利用できるので、伸長プライマーのサイズおよびハイブリダイゼーションの安定性がある程度A-T対C-Gの塩基ペアリングの比に依存することは、当業者には明らかであろう。また、当業者は、伸長プライマーと増幅された配列の他の部分との間の相同性の度合いも考慮して、それにしたがってストリンジェンシー（厳密性）を選択するであろう。このようなルーチンの実験のための指針は、例えばSambrook, J., Fritsch E.F. およびManiatis, T(1989)の「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」のような文献に見出すことができる。4つのアリコートを用いる場合、伸長プライマーは、各アリコートに別個に添加してもよいが、好ましくは、試料を4つのアリコートに分ける前に添加する。伸長プライマーは、PCRプライマーと同一であってもよいが、系にさらなる特異性の要素を導入するために、好ましくは異なるものであることは注意すべきである。

あるいは、リン酸化された5'末端を有し、ループを含み、それ自身にアニーリングするプライマー、および一本鎖テンプレート（鋳型）の3'末端を用いることができる。テンプレートの3'末端がT（テンプレート）で示される配列領域を有する場合、プライマーは、5'末端から始まる以下の配列を有する：P-

L-P'-T'、ここで、Pはプライマー特異的であり（5～30ヌクレオチド）、Lはループであり（好ましくは4～10ヌクレオチド）、P'はPに相補的であり（好ましくは5～30ヌクレオチド）、T'は3'末端のT中のテンプレート配列（少なくとも4ヌクレオチド）に相補的である。このプライマーは、T4 DNAリガーゼまたは同様の酵素を用いて一本鎖テンプレートに連結させることができる。これは、テンプレートとプライマーとの間に共有結合リンクを提供し、したがってハイブリダイズしたプライマーがプロトコルの最中に洗い落とされる可能性を回避する。

伸長プライマーおよびデオキシヌクレオチドの存在下での各アリコートにおけるポリメラーゼ反応は、ジデオキシヌクレオチドを取り込むであろうポリメラーゼ、例えばT7ポリメラーゼ、クレノウまたはシークエナーゼ（Sequenase）Ver. 2.0（USB U.S.A.）を用いて実行する。しかし、多くのポリメラーゼはプルーフリーディングまたはエラーチェック能を有すること、および鎖伸長に利用可能である3'末端はしばしば1または2以上のヌクレオチドにより消化されることが公知である。本発明の方法においてこのような消化が起こる場合、バックグラウンドのノイズのレベルが上昇する。この問題を避けるために、プルーフリーディングのないポリメラーゼ、例えばエキソヌクレアーゼ欠損（exo<sup>-</sup>）クレノウポリメラーゼを用いてもよい。そうでない場合、ポリメラーゼによる3'消化を抑制するフッ化物イオンまたはヌクレオチドモノホスフェートを各アリコートに添加することが望ましい。

本発明の方法において、十分に伸長されていないテンプレートが蓄積する場合に起こりうるバックグラウンドシグナルの急速な増大のため、各伸長工程において高い効率を有するDNAポリメラーゼを用いることが好ましい。各工程における高い正確性も望ましく、これは、エキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼを用いて達成することができる。しかし、これは、プライマーの分解が起こりうるという上述の不利益を有する。クレノウポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性は低いが、本発明者らは、プライマーの3'末端がヌクレオチドの不存在下でのより長いインキュベーションで分解されることを見出した。重合工程におけるインデュースト・フィット結合メカニズムは、非常に効率的に $10^5 \sim 10^6$ の

正確性に向かったの正味の貢献を有する正しいdNTPの結合に対して選択する。エキソヌクレアーゼ欠損ポリメラーゼ、例えば(exo)クレノウまたはシークエナーゼ2.0は、相補的なdNTPが存在するときのみ観察されるヌクレオチドの取り込みを触媒し、プルーフリーディングエキソヌクレアーゼ活性が存在しなくても、これらの酵素の高い正確性が確認された。シークエナーゼ2.0と比較して(exo)クレノウDNAポリメラーゼを用いる主な利点は、そのヌクレオチドに対するより低いKmであり、これが低いヌクレオチド濃度でさえ、高率のヌクレオチド取り込みを可能にする。すべてのdNTPをヌクレオチドアナログまたは非天然ヌクレオチド(例えばdNTP  $\alpha$  S)で置換することも可能であり、このようなアナログは、エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼと用いるためには好ましいことがある。

多くの診断用の適用、例えば遺伝性疾患のキャリアについての遺伝的試験において、試料は、ヘテロ接合体の物質を含むことになる。これは、そのDNAの半分が、標的位置に1つのヌクレオチドを有し、他の半分が別のヌクレオチドを有することになるということである。したがって、本発明の好ましい方法において4つのアリコートを用いる場合、2つは陰性シグナルを示すであろうし、2つは陽性シグナルの半分を示すであろう。したがって、各試料中の検出されたシグナルの量を定量的に決定することが望ましいことがわかるであろう。また、2またはそれ以上の同じ塩基がプライマーの3'末端に隣接する場合、より大きなシグナルが生成されることも理解されるであろう。ホモ接合体の試料の場合には、同じものを4つのアリコートにすると、3つの陰性および1つの陽性シグナルがあることは明らかであろう。

プライマーのすぐ3'側の標的塩基がその3'側と同じ塩基を有する場合、および重合がデオキシヌクレオチド(ジデオキシヌクレオチドでなく)を用いて行われる場合、伸長反応は、同時に2つの塩基を付加し、実際、試料中の連続する同一の塩基のあらゆる配列は、プライマー中への対応する塩基の同時取り込みをもたらすことは理解されるであろう。しかし、そのような反復を検出するのに何の困難もないように、解放されたピロホスフェートの量は、取り込まれた塩基の数に明らかに比例するであろう。



プライマーは、上述の手順で単一の塩基（または同一の塩基の配列）ごとに伸長されるので、伸長されたプライマーは、正確に同じようにして、繰り返した手順において配列中の次の塩基の決定に役立つことができ、したがって試料全体の配列決定が可能になる。試料およびハイブリダイズしたプライマーの固定化は、次の工程に進む前に不要なデオキシヌクレオチドを分離するための洗浄を可能にする。

本発明は、固定化DNAの配列決定の、2つの基本的な方法を提供する。

A. 本発明は、試料DNAの配列決定の第一の方法を提供する。この方法においては、試料DNAを増幅に供し；増幅されたDNAを固定化して、次に鎖分離に供し、固定化されていない鎖を除去し、配列決定すべきDNAのその部分にすぐに隣接する固定化DNAにハイブリダイズする伸長プライマーを用意し；次に、固定化一本鎖DNAの4つのアリコートの各々を、デオキシヌクレオチドの存在下でポリメラーゼ反応に供し、ここで、各アリコートには異なるデオキシヌクレオチドを用いることによって、標的位置の塩基に相補的なデオキシヌクレオチドのみが取り込まれるようにし；塩基取り込みにより放出されたピロホスフェートを同定し；次に固定化試料およびプライマーを、反応溶液から分離し、重合条件下で試料／プライマーの反応していないアリコートに取り込まれた塩基を添加して、上記の取り込まれた塩基によりすべてのアリコート中でプライマーを伸長させ、次に固定化した試料／プライマーを、反応溶液から分離し、試料DNAを配列決定するためにこのプロセスを繰り返す。

B. 本発明は、試料DNAを配列決定する第二の方法も提供する。この方法においては、試料DNAを増幅に供し；増幅されたDNAを固定化し、次に鎖分離に供し、固定化されていない鎖を除去し、配列決定すべきDNAのその部分にすぐに隣接する固定化DNAにハイブリダイズする伸長プライマーを用意し；次に、固定化一本鎖DNAを第一のデオキシヌクレオチドの存在下でポリメラーゼ反応に供し、ピロホスフェートの放出の度合いを決定し、必要な場合、固定化試料およびプライマーを反応混合物から分離し、反応を、第二、第三、第四のデオキシヌクレオチドの連続的な添加によって、ピロホスフェートの陽性の放出が特定のデオキシヌクレオチドのプライマー中への取り込みを示すまで繰り返し、そこ

で、手順を、1度に1塩基プライマーを伸長するよう、また、各段階で伸長されたプライマーのすぐ3'側の塩基を決定するよう、繰り返す。

解析のための代替的なフォーマットの1つは、試料が例えば微細に制作されたチップの表面に分布されたアレイ (array) フォーマットを用いることであり、それにより試料の秩序だったセットを2次元フォーマットに固定化してもよい。多くの試料をこれにより並行して解析することができる。本発明の方法を用いれば、酵素および1つのヌクレオチドを含有する溶液を表面から流出させて、次に各試料について生成されたシグナルを検出することにより、このようにして多くの固定化テンプレートを解析することができる。こうして、この手順を繰り返すことができる。あるいは、テンプレートに相補的ないくつかの異なるオリゴヌクレオチドを表面に分布させ、続いてテンプレートのハイブリダイゼーションを行ってもよい。デオキシヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドの取り込みは、プライマーとして種々のオリゴヌクレオチドを用いて生成されたシグナルにより各ヌクレオチドについてモニタリングしてもよい。表面の異なる区域からのシグナルを一緒にすることにより、配列ベースの解析を、種々のジデオキシヌクレオチドを用いてポリメラーゼ反応の4つのサイクルにより行ってもよい。

本発明者らによる係属中の出願WO90/11369に記載されているような (ネステッド・プライマーを用いる) 2段階PCRを用いて、シグナル対ノイズ比を強化し、それにより本発明の方法の感度を増大させてもよい。このような予備的な増幅により、標的DNAの濃度は、試料中に存在する他のDNAに関して大きく増大し、標的DNAの異なる配列に対して特異的な少なくとも1つのプライマーを用いる第二段階の増幅は、「バックグラウンドノイズ」に対して標的DNAによるシグナルを有意に増強する。

一段階または二段階PCRのどちらを行うかに拘らず、PCRの効率は重要ではない。これは、本発明は、アリコートからの異なる区別される差異に依存するためである。しかし、上述したように、増幅されたDNAの存在または不存在のチェックとして最初の定性的DIANAを行うことが好ましい。

任意の好適なポリメラーゼを用いてよいが、PCRの各サイクルにおいて、さらにポリメラーゼ (例えばクレノウフラグメント) を添加する必要なしに反復的

な温度サイクルを可能にするために、Taqポリメラーゼのような好熱性酵素を用いることが好ましい。

最初に標的DNAを増幅する好ましい方法として上記でPCRを記載したが、当業者は、PCRの代わりに、またはそれと組み合わせて、他の方法を用いてもよいことを理解するであろう。最近開発された温度サイクルまたは熱安定性ポリメラーゼの使用を必要としない増幅技術の1つは、Self Sustained Sequence Replication (3SR)である。3SRは、レトロウイルスの複製をモデルとしており、増幅に用いることができる（例えば、Gingeras, T.R. et al., PNAS (USA) 87: 1874-1878およびGingeras, T.R. et al., PCR Methods and Applications Vol.1, pp. 25-33を参照されたい）。

上で示したように、この方法は、ジデオキシヌクレオチド残基がDNA鎖の末端に取り込まれる場合、ピロホスフェートの放出を同定することに適用することができる。WO 93/23562は、DNA配列の単一の標的位置での塩基の同定方法（ミニ・シーケンシング）に関する。この方法においては、試料DNAを増幅に供し；増幅されたDNAを固定化し、次に鎖分離に供し、固定化されていない鎖を除去し、標的位置にすぐ隣接する固定化DNAにハイブリダイズする伸長プライマーを用意し；固定化一本鎖DNAの4つのアリコートの方々を、次に、ジデオキシヌクレオチドの存在下でポリメラーゼ反応に供し、各アリコートには異なるジデオキシヌクレオチドを用いて、それにより標的位置の塩基に相補的なジデオキシヌクレオチドのみが取り込まれるようにし；次に、4つのアリコートを4つすべてのデオキシヌクレオチドの存在下で伸長反応に供し、それにより各アリコートにおいてジデオキシヌクレオチドと反応していないDNAを伸長させて二本鎖DNAを形成させ、一方、ジデオキシでブロックされたDNAフラグメントを一本鎖のまま残し；続いて二本鎖および／または一本鎖DNAを同定して、どのジデオキシヌクレオチドが取り込まれたか、それゆえどの塩基が標的位置に存在したかを示す。明らかに、鎖停止ジデオキシヌクレオチド反応におけるピロホスフェートの放出は、どの塩基が取り込まれたかを示すが、その後のデオキシヌクレオチドプライマー伸長反応（いわゆるチェース反応）において放出された比較的大量のピロホスフェートは、はるかに強いシグナルを与えるので、

より高感度である。

通常、ジデオキシヌクレオチドなしの対照（コントロール）および4つすべてのジデオキシヌクレオチドの混合物を含有する「ゼロ対照」を設けることが望ましい。

WO 93/23562は、「ジデオキシヌクレオチド」という用語を、さらなる鎖伸長を防止することにより同じように作用する3'保護2'デオキシヌクレオチドを含むものとして定義している。しかし、3'保護基が、（例えば加水分解によって）除去可能であれば、鎖伸長（単一塩基による）の後に3'位のブロック除去を続け、伸長された鎖をさらなる伸長反応の準備ができた状態にしてもよい。このようにして、鎖伸長は、上で論じたような同一塩基の配列についての複雑さなしに、一度に1つの位置を進むことができる。したがって、上述の方法AおよびBは、改変することができ、それにより各段階で付加された塩基が3'保護2'デオキシヌクレオチドであり、この塩基が付加された（および発光が検出された）後に、3'保護基を除去して、さらに3'保護2'デオキシヌクレオチドが付加されるのを可能にする。好適な保護基としては、アルカノール基のようなアシル基、例えばアセチル、または実際当業界で公知の任意のヒドロキシル保護基、例えば「Protective Groups in Organic Chemistry」JFW McOnie, Plenum Press, 1973に記載されているものが挙げられる。

本発明は、上記の態様において、単一塩基変化の検出のための簡便で迅速な方法を提供する。好ましいフォーマットにおいては、これは2つの技術、すなわち固相技術（磁気ビーズに結合させたDNA）および酵素的発光計測検出アッセイ（ELIDA）を成功裏に一緒にする。この方法は、選択的に増幅されたDNAフラグメントを同定および定量するために用いることができる。それはまた、単一塩基置換の検出および増幅された多型遺伝子フラグメントについてのヘテロ接合性インデックスの推定のためにも用いることができる。これは、この方法が、後天的および遺伝性疾患の両方に関与する希な点突然変異についてスクリーニングするため、DNA多型を同定するため、また、ウイルスまたは細菌の薬剤耐性および薬剤感受性株を遠心分離、ろ過、抽出または電気泳動する必要なしに区別するためにさえ用いることができることを意味する。この方法は、その簡便性

のため、多くの医療的（広い範囲の遺伝性疾患におけるルーチンの解析）および商業的適用に好適である。

以下に表す陽性的実験結果は、この方法が段階的単一デオキシヌクレオチドの取り込みを伴う、オンライン自動化非電気泳動的固相DNA配列決定法に適用可能であることを明らかに示す。増幅し、磁性ビーズに固定化し、一本鎖DNAを得るために融解し、そしてプライマーとアニーリングさせた後、テンプレート／プライマーフラグメントを、dNTPインキュベーションおよび洗浄の反復的サイクルにおいて用いる。試料は、ELIDAにおいて連続的にモニタリングする。DNAの合成には、取り込まれたヌクレオチドの量と等しい量の無機ピロホスフェート（PPi）の放出が付随するので、ELIDAにおけるシグナルは、相補的な塩基が取り込まれたときにのみ観測される。PPiを定量的に決定することの方法の能力のため、2個または数個の同時の取り込みから単一塩基の取り込みを区別することが可能である。DNAテンプレートは、好ましくはPCRによって得られるため、そのようなアッセイについて必要とされるDNAの量を増加させることは、比較的容易である。

上述のように、本発明者らの結果は、電気泳動によらない大規模な固相DNA配列決定の新規なアプローチの可能性を拓くものであり、この配列決定法は、時間とともに重合反応の進行を連続的に決定することを可能にする。このようなアプローチの成功のためには、「フェーズが合っていない（not “in phase”）」テンプレートが蓄積する場合に急速に増大するバックグラウンドシグナルのため、DNAポリメラーゼの高い効率の必要性がある。この新規なアプローチは、標準的配列決定法と比較して、いくつかの利点を有する。第一に、この方法は、複数の試料を並行して取り扱うのに適している。第二に、比較的費用に対する効果のよい装置を企図することができる。さらに、この方法は、電気泳動の使用を避け、それにより試料の装填およびゲルの作製を回避する。

有利には、本発明の方法は、WO 93/23563において教示されている方法と組み合わせてもよい。その方法は、PCRを用いて、目的のDNA鎖の3'末端に永久的に付着した3'プライマーを提供するループ構造を導入する。例えば、このような改変された方法においては、伸長プライマーを、標的位置を含む

二本鎖DNAの1つの鎖の標的配列上に3'末端ループ構造の一部として導入し、前記標的配列は、その3'末端に領域Aを有し、場合によっては領域Aから3'側に伸びるDNA領域Bを有し、それにより、標的配列に相補的な配列の3'末端にハイブリダイズする第一のプライマー（この第一のプライマーは固定化されているか、または固体支持体への付着手段を備えている）と、標的配列のAおよび／またはBの少なくとも一部分にハイブリダイズする3'末端配列を有する一方で実質的にAと同一の配列をその5'末端に有する第二のプライマーとを用いて、前記二本鎖DNAをポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅に供し、前記増幅により標的配列の3'末端に二本鎖標的DNAを、以下の順序：領域A、ループを形成することができる領域、および配列Aに相補的な配列A'で生成させ、その後、増幅された二本鎖DNAを固定化形態で鎖分離に供し、それにより固定化されていない標的鎖を放出させて領域A'が領域Aにハイブリダイズできるようにするかハイブリダイズを起こさせ、それにより前記ループを形成する。領域A'の3'末端は、標的位置のすぐ隣にハイブリダイズする。ジデオキシおよび／または伸長反応は、ハイブリダイズした部分をプライマーとして用いる。この原理を用いた実験は、本明細書の実施例において記載したように、成功裏に行われた。

本発明はまた、本発明の方法において使用するためのキットをも含む。キットは、通常、少なくとも以下のものを含む：

- (a) 標的位置がプライマーの3'末端に直接隣接するように試料DNAにハイブリダイズする試験特異的プライマー；
- (b) ポリメラーゼ；
- (c) ピロホスフェート放出を同定するための検出酵素手段
- (d) dATPの代わりに、ポリメラーゼの基質として作用することができるが前記PPi検出酵素の基質として作用することはできないdATPアナログを含むデオキシヌクレオチド；および
- (e) 場合により、ジデオキシヌクレオチド、場合により、ddATPは、ポリメラーゼの基質として作用することができるが前記PPi検出酵素の基質として作用することはできないddATPアナログで置換されているもの。

キットが、最初のPCR増幅について使用するためのものである場合、通常は、少なくとも以下の成分をも含む：

- (i) 少なくとも1つのプライマーがプライマーの固定化を可能にする手段を有する1対のPCRプライマー；
- (ii) 好ましくは熱安定性である、ポリメラーゼ（例えばTaq I ポリメラーゼ）；
- (iii) PCR反応のための緩衝液；および
- (iv) デオキシヌクレオチド。

酵素標識を用いてPCRを評価する場合、キットは、有利には酵素の基質および検出系の他の成分を含む。

本発明を、非制限的な例および図面の参照により説明する。

図面において、

図1は、リアルタイムDNA配列決定法の模式図である。4つの異なるヌクレオチドを、プライマーにハイブリダイズした固定化テンプレートに段階的に添加する。DNAポリメラーゼ触媒反応において放出されたPPiは、ATPスルフィラーゼおよびルシフェラーゼにより触媒される反応によって検出される。シグナルの高さは、取り込まれた塩基の数に比例する。各塩基の添加の後、洗浄工程を行う。これらの工程を、サイクルで繰り返し、テンプレートの配列を推定する。

図2は、ルシフェラーゼ反応に対するdATPおよびdATP  $\alpha$  Sの影響を示す。0.1 nmolのdATPおよび8 nmolのdATP  $\alpha$  Sを示したとおりに添加し、発光のアウトプットを検出した。

図3は、テンプレート濃度の関数としてのPPi合成の程度を示す。3 pmolの(exo)クレノウを、1または2 pmolのE3PN/NUSPTとともに、示したとおりにインキュベートした。反応は、40 pmolのdCTPを添加することにより開始した。放出されたPPiは、ELIDAによって検出した。

図4は、3つの異なるテンプレートへの1塩基の取り込みのリアルタイム検出を示す。1.5 pmolの示したテンプレートを3 pmolの(exo)クレノウとともにインキュベートした。反応は、40 pmolの示したデオキシヌクレオチドを

添加することにより開始し、放出されたPPiは、ELIDAによって検出した。

図5は、ストレプトアビジンでコーティングした常磁性ビーズ上に固定化した、PCRで生成した291塩基の長さの一本鎖テンプレートについて行ったリアルタイムDNA配列決定を示す。約1 pmolのテンプレート/プライマー（NUSPT）を、3 pmolの（exo<sup>-</sup>）クレノウとともにインキュベートした。反応は、40 pmolの示したデオキシヌクレオチドを添加することにより開始し、放出されたPPiは、ELIDAによって検出した。各ヌクレオチドの添加の間に、ビーズを洗浄した。与えられたELIDAシグナルは、洗浄手順の間のビーズの損失について補償した。半自動化固相DNA配列決定法により確認されたとおりの、プライマーの後のDNA配列を、図に挿入してある。

図6は、一方のプライマーがビオチニル化されているループ構造を生成するためのPCRの使用の模式図を示す。PCR生成物を固定化し、非ビオチニル化鎖をアルカリで溶出させた。ビオチニル化鎖は、ハイブリダイズさせて、ループ構造を作らせた。このループ構造を、図1に説明し、実施例1に記載したように、リアルタイムDNA配列決定法のためのテンプレートとして用いた。

図7は、ストレプトアビジンでコーティングした常磁性ビーズ上に固定化した、PCRで生成されたループ構造について行ったリアルタイムDNA配列決定法を示す。約2 pmolのテンプレートを、3 pmolの（exo<sup>-</sup>）クレノウDNAポリメラーゼとともにインキュベートした。反応は、40 pmolの示したデオキシヌクレオチドを添加することにより開始し、放出されたPPiは、ELIDAによって検出した。ループ構造は、PCR反応中に3'末端への余分のAの付加を可能にするように設計した。これは、いくつかの熱安定性DNAポリメラーゼ（例えばTaq DNAポリメラーゼ）は、ターミナルトランスフェラーゼ活性を示し、3'末端に非テンプレート依存性の余分のAを付加するためである。

図8は、ストレプトアビジンでコーティングしたキャピラリ上に固定化したDNAフラグメントにハイブリダイズしたプライマーを用いた構成（セットアップ）の模式図を示す。



## 実施例 1

### 材料および方法

#### オリゴヌクレオチドの合成および精製

オリゴヌクレオチド E 2 P N (55mer :

5'CGACGATCTGAGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAACTGGCCGTCGTTTT  
ACAACG3')、

E 3 P N (35mer :

5'GCTGGAATTCGTCAGACTGGCCGTCGTTTTACAAC3')、

N U S P T (5'CTAAAACGACGGCCAGT3')、

R I T 2 0 3

(5'AGCTTGGGTTCGAGGAGATCTTCCGGGTACGGCGGAAGATCTCCTC  
GAGG)、

R I T 2 0 4

(5'AGCTCCTCGAGGAGATCTTCCGCCGTAACCCGGAAGATCTCCTCGAA  
CCCA)、

R O M O 2 0 5 S

(5'CGAGGAGATCTTCCGGGTACGGCG)、

R I T 2 8、R I T 2 9、および U S P (Hultman, T., Murby, M., Stahl, S., Horne  
s, E., and Uhlen, M. (1990) Nucleic Acids Res. 18, 5107-5112) を、自動化 DNA  
合成装置 (Gene Assembler Plus, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を用  
いてホスホルアミダイト化学により合成した。精製は、迅速タンパク液体クロマ  
トグラフィ p e p R P C 5 / 5 カラム (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)  
によって行った。

#### インビトロ増幅およびテンプレート調製

P C R 反応は、プラスミド p R I T 2 8 のマルチリンカー上で、Hultman ら (前出) にしたがって 7.5 pmol の一般プライマー R I T 2 8 および R I T 2 9 を用いて行った。P C R 生成物をストレプトアビジンでコーティングした超常磁性ビーズ Dynabeads [ (登録商標) M 2 8 0 - ストレプトアビジンまたは M 4 5 0 - ストレプトアビジン (Dynal A. S., Oslo, Norway) ] 上に固定化した。一本鎖

DNAの生成および配列決定プライマーとのハイブリダイゼーションは、以前に記載されたように行った(Nyren, P., Pettersson, B., and Uhlen, M. (1993) Anal. Biochem. 208, 171-175)。

#### リアルタイムDNA配列決定

オリゴヌクレオチドE3PNおよび上述のPCR生成物を、リアルタイムDNA配列決定のためのテンプレートとして用いた。オリゴヌクレオチドE3PNを、上述のようにストレプトアビジンでコーティングした超常磁性ビーズ[Dynabeads (登録商標) M280-ストレプトアビジンまたはM450-ストレプトアビジン]上に固定化し、この固定化されたテンプレートにプライマーをハイブリダイズさせた。固定化されたDNAフラグメントを、改変T7DNAポリメラーゼ(Sequenase 2.0; U.S. Biochemical, Cleveland, OH, USA)、クレノウDNAポリメラーゼ(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)またはエキソヌクレアーゼ欠損(exo-)クレノウDNAポリメラーゼ(Amersham, UK)のいずれかとともにインキュベートした。配列決定手順は、異なるデオキシヌクレオシドトリホスフェート(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)の連続的な付加の際のプライマー鎖の段階的伸長により行った。各ヌクレオチド付加の間の固定化DNAフラグメントの洗浄は、2工程で行った: 最初に、10mMトリス-HCl (pH 7.5)、0.25M NaCl、0.1% Tween 20を含有する緩衝液を用い、次に10mMトリス-アセテート(pH 7.5)を用いた。ヌクレオチド取り込みのために放出されたPPiは、ELIDAによって検出した[Nyren, P. (1987) Anal. Biochem. 167, 235-238]。発光は、電位差計測レコーダーに接続したLKB 1250ルミノメーターを用いて測定した。ルミノメーターは、内部光標準について10mVの応答を与えるように校正した。発光アウトプットは、既知の量のATPまたはPPiの添加により校正した。標準的アッセイ容量は、0.2mlであり、以下の成分を含有していた: 0.1Mトリス-アセテート(pH 7.75)、2mM EDTA、10mMマグネシウムアセテート、0.1%ウシ血清アルブミン、1mMジチオスレイトール、5μMアデノシン5'-ホスホスルフェート(APS)、0.4mg/ml ポリビニルピロリドン(360, 000)、100μg/ml D-ルシフェリン(BioOrbit, Finland)、4μg/

ml ルシフェリン (BioOrbit, Finland)、0.3 U/ml ATPスルフリラーゼ (ATP:スルフェートアデニリルトランスフェラーゼ; EC 2.7.7.4) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)、精製ルシフェラーゼ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)、0.1  $\mu$ M ATPについて200 mVの応答を与える量。1 pmolの固定化DNAフラグメントおよび3 pmolのDNAポリメラーゼを上記の溶液に添加した。配列決定反応は、40 pmolのヌクレオチドの1つ (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を添加することによって開始させた。反応は、室温で行った。ルシフェラーゼ反応に対するdATPおよびdATP  $\alpha$ Sの影響を調べる場合は、APSおよびATPスルフリラーゼの両方をアッセイから除外した。

#### 半自動化固相DNA配列決定

リアルタイムDNA配列決定により得られた配列データを、半自動化固相配列決定法 [Hultman, T., Bergh, S., Moks, T., and Uhlen, M. (1991) Biotechniques 10, 84-93] により確認した。

#### 結果

##### 配列決定法の原理

配列決定法の原理を図1において説明する。目的の特異的DNAフラグメントを固体支持体上に (例えばビオチン/ストレプトアビジンカップリングによって) 固定化し、続いて一本鎖形態に変換する。この一本鎖DNAに配列決定プライマーをハイブリダイズさせ、デオキシヌクレオチドとのインキュベーションおよび洗浄のサイクルの繰り返しを行う。DNAの合成は、取り込まれたヌクレオチドのそれに等しいモル濃度のPPiの放出を伴う。それにより、相補的な塩基が取り込まれた場合にのみ、ELIDAによって、リアルタイムのシグナルを得る。ELIDAにおいては、生成されたPPiは、ATPスルフリラーゼによりATPに変換され、次に、ATPの量をルシフェラーゼアッセイによって決定する (図1)。ELIDAの結果から、プライマーの後の配列を推定する。

##### ルシフェラーゼ系に対するdATPおよびdATP $\alpha$ Sの影響

本発明者らは、dATPがNyrenらにより記載された (前出) ルシフェラーゼ発光アッセイの検出系に干渉することを観察した。この干渉は、この方法を単

一塩基取り込み事象を検出するために用いる場合、大きな問題である。このバックグラウンド活性を低減させるためにいくつかのアプローチを試験したが（データは示していない）、それらの中で最大の成果は、天然dATPをdATP $\alpha$ Sで置き換えることによって達成された。図2は、ルシフェラーゼアッセイの間にdATPおよびdATP $\alpha$ Sを用いた結果を示す。0.1 nmolのdATPの添加により、発光が即時的に増大され、続いて定常状態レベルに達するまでゆっくり減少した。dATPの添加後の発光の定常状態レベルの増加は、同等のATPの添加からの1～2%の発光に相当する。dATPのこの影響は、dATPを添加することによって配列決定反応を開始させることを不可能にする。反応は、その代わりに、DNAポリメラーゼの添加によって開始されなければならない。シグナル対ノイズ比もまた、他のヌクレオチドに比較してdATPについてより高くなる。その一方で、8 nmolのdATP $\alpha$ S（dATPより80倍高い量）の添加は、ルシフェラーゼに対してほんのわずかの影響しか与えない（図2）。図2から、dATP $\alpha$ Sが、ルシフェラーゼの基質としてdATPの0.05%未満しか有効ではないことが推定される。これらの結果にしたがって、dATPの代わりにdATP $\alpha$ Sを、このヌクレオチドを許容するDNAポリメラーゼとともに用いることについて、大きな利点がある。

#### 固相技術

いくつかの異なるパラメーターを、2つの異なる合成DNAテンプレートを用いてモデル系において最適化した。いくつかの塩基の配列決定を単純化するために、DNAを固相上に固定化した。ここで、本発明者らは、Dynalからの2つのタイプのストレプトアビジンコーティングを有する超常磁性ビーズ、M280およびM450を用いた。これらのビーズの両タイプは、高い結合容量を有している。本発明者らは、大きい方のビーズ（M450）がその速い沈降速度のため迅速な洗浄手順を可能にすることを見出した（データは示していない）。平滑末端DNAポリメラーゼ活性を排除するために（Clak, J.M. (1991) Gene, 104, 75-80）、テンプレートの3'末端から少なくとも1塩基内側にアニーリングする配列決定プライマーを選択した。図3においては、単一塩基取り込み事象を、2つの異なるプライマー/テンプレート濃度について示す。反応は、次の正しい

塩基 (dCTP) の添加により開始させた。軌跡は、この塩基の取り込み中の P P i の放出を示す。相補的でない塩基を添加した場合には、P P i の取り込みは観察されなかった (データは示していない)。後の実験においては、1 pmol のプライマー/テンプレートを用い、関連シグナル差を記録した (図 3)。最初速度および E L I D A 中に形成された P P i の割合は、広い間隔内で DNA の濃度に比例する (Hultman ら、前出)。アッセイの上限は、形成された P P i で 200 pmol (1  $\mu$ M) [Nyren, P. and Lundin, A. (1985) Anal. Biochem. 151, 504-509]。下限は、主に、用いた容量、および異なる溶液中の P P i および A T P の夾雑によって決定される。

#### DNA ポリメラーゼ濃度の影響

次の一連の実験において、配列決定手順に対するポリメラーゼ濃度の影響を調べた。本発明者らは、すべての遊離 3' 末端が伸長されることを確実にするためにはプライマー/テンプレートに対して過剰のポリメラーゼを用いることが重要であることを見出した。より低いポリメラーゼ濃度では、2 相型の動態 (速い相のあとに遅い相) が観察された (データは示していない)。速い相の規模は、存在する酵素の量について化学量論的であり、遅い相は、定常状態の取り込み速度と同じである。遅い相についての律速工程は、伸長されたプライマー/テンプレートからのポリメラーゼの解離およびその後の伸長されていないプライマー/テンプレートへの結合である。ヌクレオチド濃度の間数としての取り込み速度も調べた。本発明者らは、1 塩基取り込みについての  $K_m$  が、クレノウおよび Sequenase 2.0 についてそれぞれ 0.2 および 0.4  $\mu$ M であることを観察した (データは示していない)。後者の結果は、文献のデータと一致している [Van Draanen, N. A., Tucker, S. C., Boyd, F. L., Trotter, B. W., and Reardon, J. E. (1992) J. Biol. Chem. 267, 25019-25024]。

#### リアルタイム DNA 配列決定

新規なアプローチの可能性を調べるために、異なる合成テンプレートならびに P C R 生成物を、配列決定した。3 つの異なるプライマー/テンプレート上での 1 塩基の伸長を、図 4 に示す。ヌクレオチド取込みの速度および程度 (傾きおよびシグナルの高さ) の両方が、試験した 3 つのタイプのテンプレートについて同

様であった。図5においては、291塩基の長さの一本鎖PCR生成物の15塩基のリアルタイム配列決定を示す。配列決定手順は、dATP $\alpha$ Sの添加により開始した。ELIDAにおいて、塩基取り込みによるPPi放出は検出されなかった。観察された小さいシグナルは、ヌクレオチド溶液中のPPiの夾雑によるものである。洗浄工程の後に、dGTPを添加した。1つの残基の取り込みに相当するシグナルが観察された。次に添加した塩基はdCTPであった。2つの同一塩基の取り込みに相当するシグナルは検出されなかった。続くdTTPの添加は何のシグナルも与えなかった。その後、dATP $\alpha$ Sを再び添加した。このとき、2つの同一塩基の取り込みが認められた。後者の検出された取り込みは、dATP $\alpha$ Sはクレノウポリメラーゼによりプライマー／テンプレート中に効率的に取り込まれるという以前の観察〔Vosberg, H. P., and Eckstein, F. (1977) *Biochemistry* 16, 3633-3640〕を確認した。1つの残基の取り込みに相当するシグナルは、次の添加(dGTP)の後に得られた。このサイクル手順を継続することにより、配列についてのさらなる情報が得られた。同一の残基のストレッチが存在する場合により長い伸長を可能にするために十分なヌクレオチドを添加しなければならないことに注目することは重要である。配列決定手順を、同じテンプレート上で数回繰り返し、同じ結果を得た。図5においては、洗浄手順中のビーズの凝集および損失によるシグナルの低減(光学密度の低減により測定した)を補償した。損失は、M280ビーズについてよりもM450ビーズについての方が少なかった。得られた配列は、半自動化固相サンガー配列決定法により確認した(データは示していない)。

## 実施例 2

### 材料および方法

#### ヘアピンベクター pRIT28HP の構築およびテンプレートの調製

オリゴヌクレオチド RIT203 および RIT204 (実施例 1 に記載したように調製したもの) をハイブリダイズさせ、HindIII (Pharmacia, Biotech, Uppsala, Sweden) で予め制限したプラスミド pRIT28 (Hultman ら、1990、前出) に連結した。7.5 pmol のプライマー対 RIT29 / ROMO205 S、

200  $\mu$ M dNTP、20mM トリス-HCl (pH 8.7)、2mM MgCl<sub>2</sub>、0.1% Tween 20 および1単位のAmpliTaq DNAポリメラーゼ (Perkin Elmer, Cetus, Emeryville, USA) を用い、最終容量を50  $\mu$ lとして、pRIT28HPプラスミドのマルチリンカー上でPCR反応を行った。温度プロフィールは、95℃で15秒の変性工程および72℃で90秒のアニーリング/伸長工程を含んでいた。これらの工程を、GeneAmp PCRシステム9600 (Perkin Elmer, Cetus, Emeryville, USA) を用いて35回繰り返した。ビオチニル化されたPCR生成物を、ストレプトアビジンでコーティングされた超常磁性ビーズ [Dynabeads (登録商標) M280-ストレプトアビジン、DynaL A.S., Oslo, Norway] 上に固定化した。ビーズは、製造者 (DynaL A.S., Oslo, Norway) により記載されているように使用した。固定化されたPCR生成物を0.1M NaOH中で5分間インキュベートした後、上清を除去することにより、一本鎖DNAを得た。固定化された一本鎖DNAを、まず1×TE (10mM トリス-HCl、1mM EDTA、pH 7.5) で洗浄し、20mM トリス-HCl (pH 7.5)、8mM MgCl<sub>2</sub>中で、65℃で5分間ハイブリダイズさせ、リアルタイムDNA配列決定のためのループ構造を作成した。

#### ループ構造上でのリアルタイムDNA配列決定

調製した、超常磁性ビーズ上に固定化されたループ構造を、(exo)クレノウDNAポリメラーゼとともにインキュベートした。実施例1に記載したように配列決定手順を行った。

#### 結果

リアルタイム配列決定における使用のためのテンプレートとしてループ構造を生成する原理を、図6に示す。この方法は、1つのみのビオチニル化されたプライマーの使用を包含し、このプライマーが、ハイブリダイズした増幅生成物を固定化するために用いられる。非ビオチニル化鎖は除去され、ハイブリダイゼーションによるループ構造の形成を可能にする。固定化されたループ構造の使用の結果を、後の12回の配列決定サイクルについて図7に示す。この方法によって、ループプライマーに隣接する最初の10塩基の配列を決定することができた。

配列決定は、固体支持体としてキャピラリー (毛細管) を用いて行ってもよい。

ハイブリダイズしたプライマーを有する固定化DNAフラグメントを用いての構成（セットアップ）についての模式図（例1のような）を、図8に示す。同様のセットアップを、ループプライマーを有する固定化DNAフラグメントについて用いてもよい。

【図1】

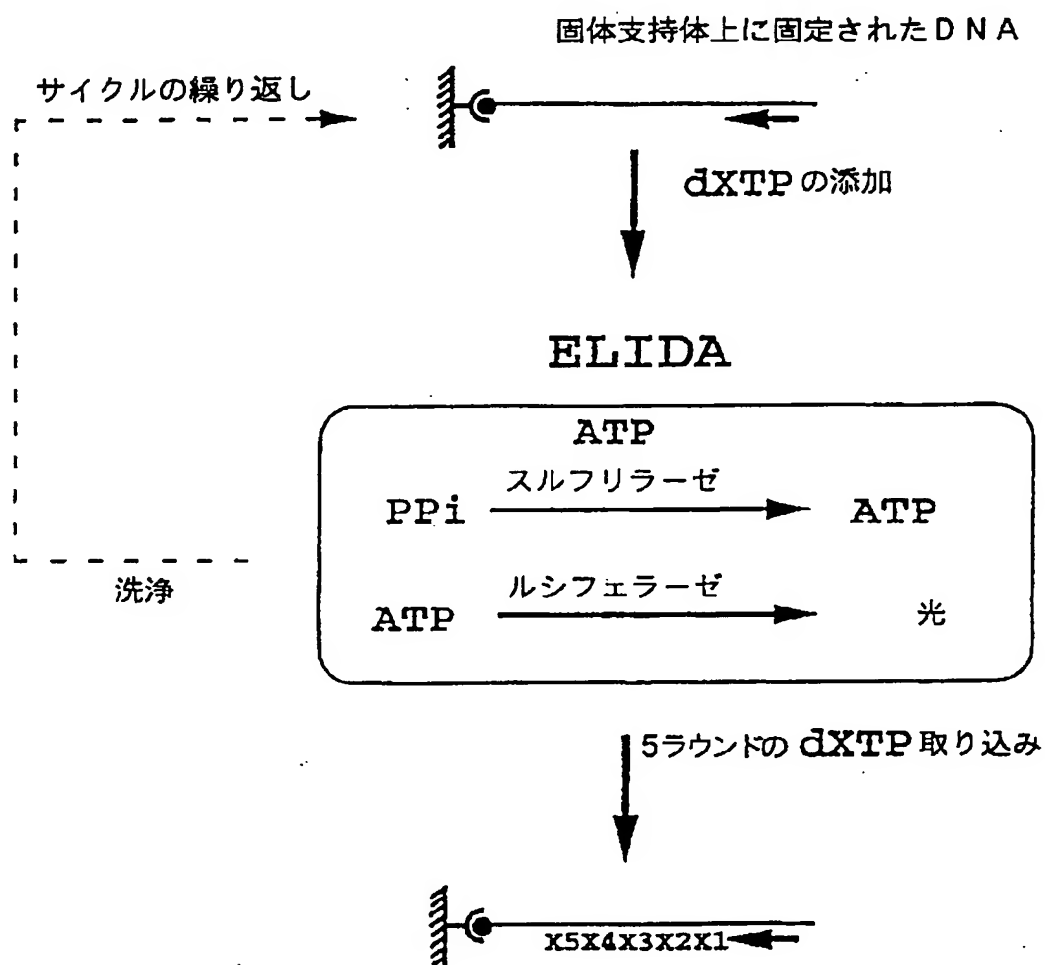
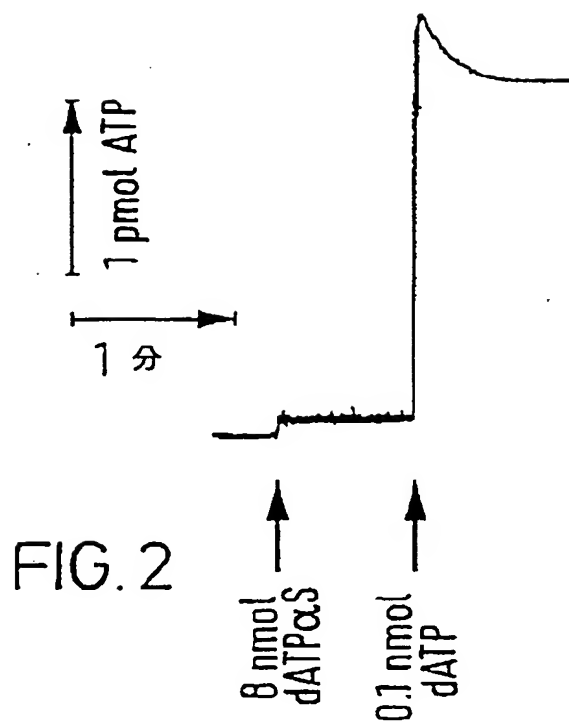


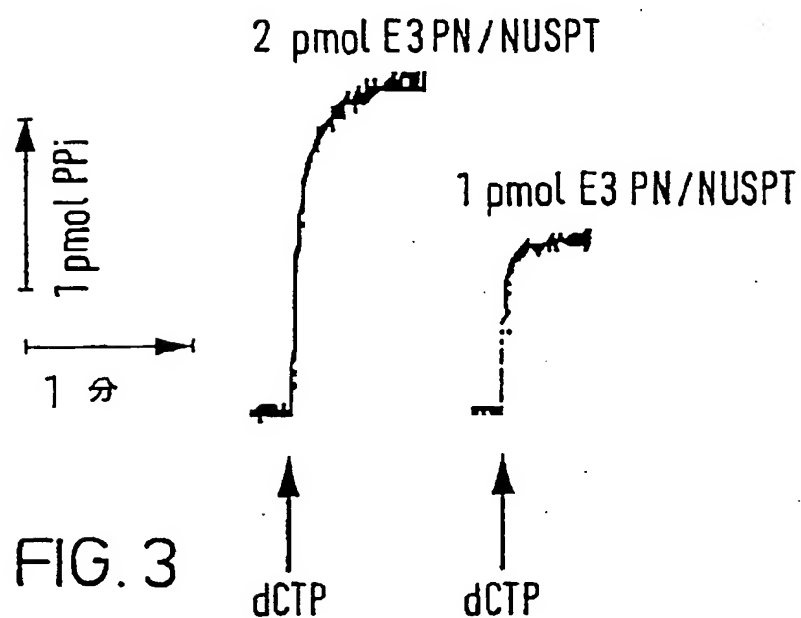
FIG. 1



【图2】



【图3】



【図4】

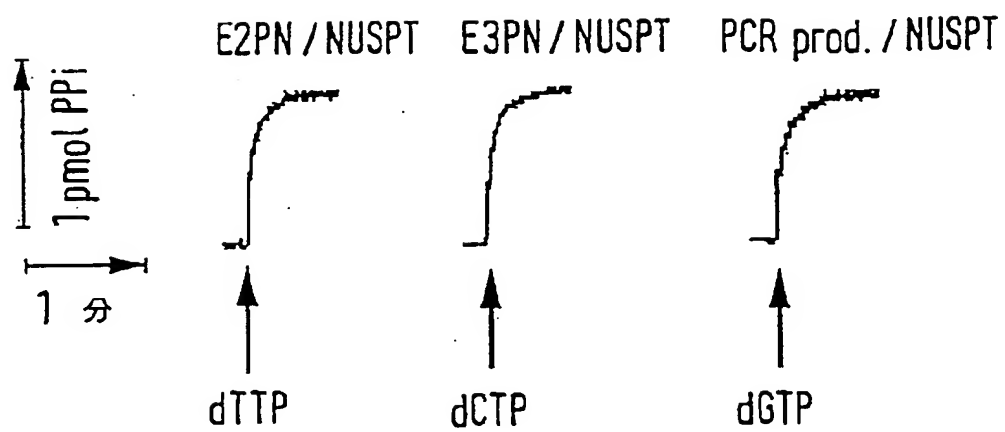


FIG. 4

【図5】

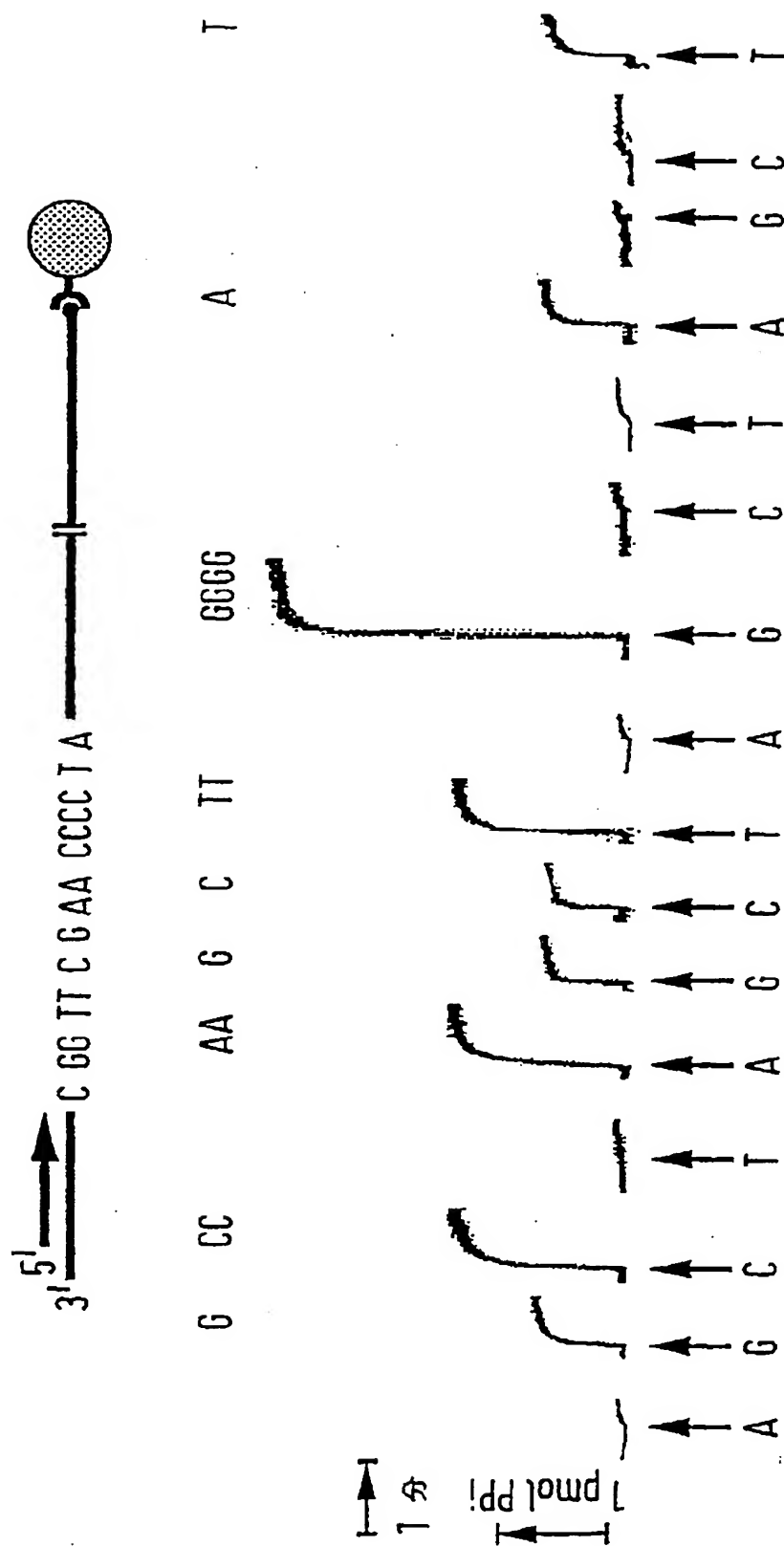


FIG. 5

【図6】

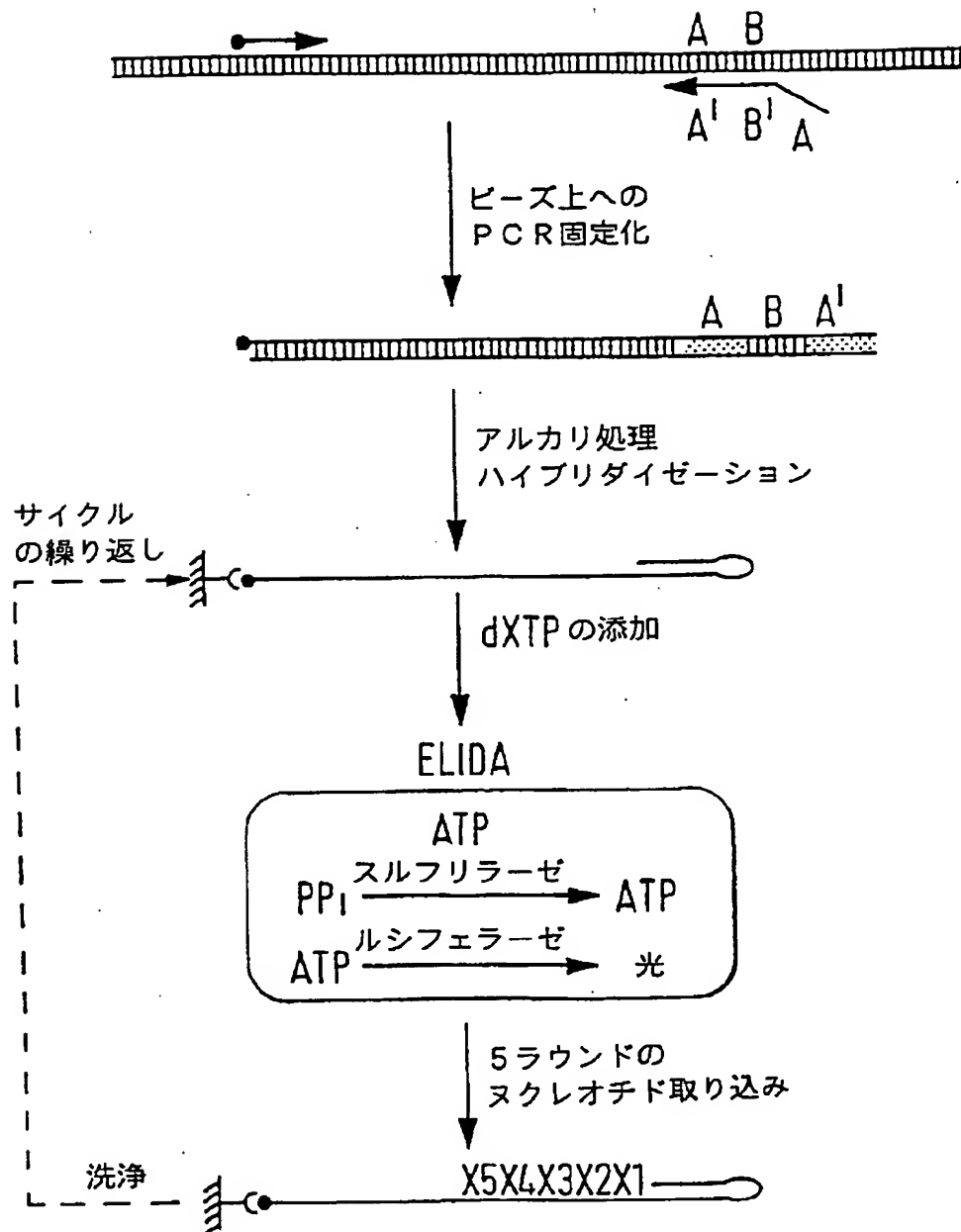


FIG. 6



【図8】

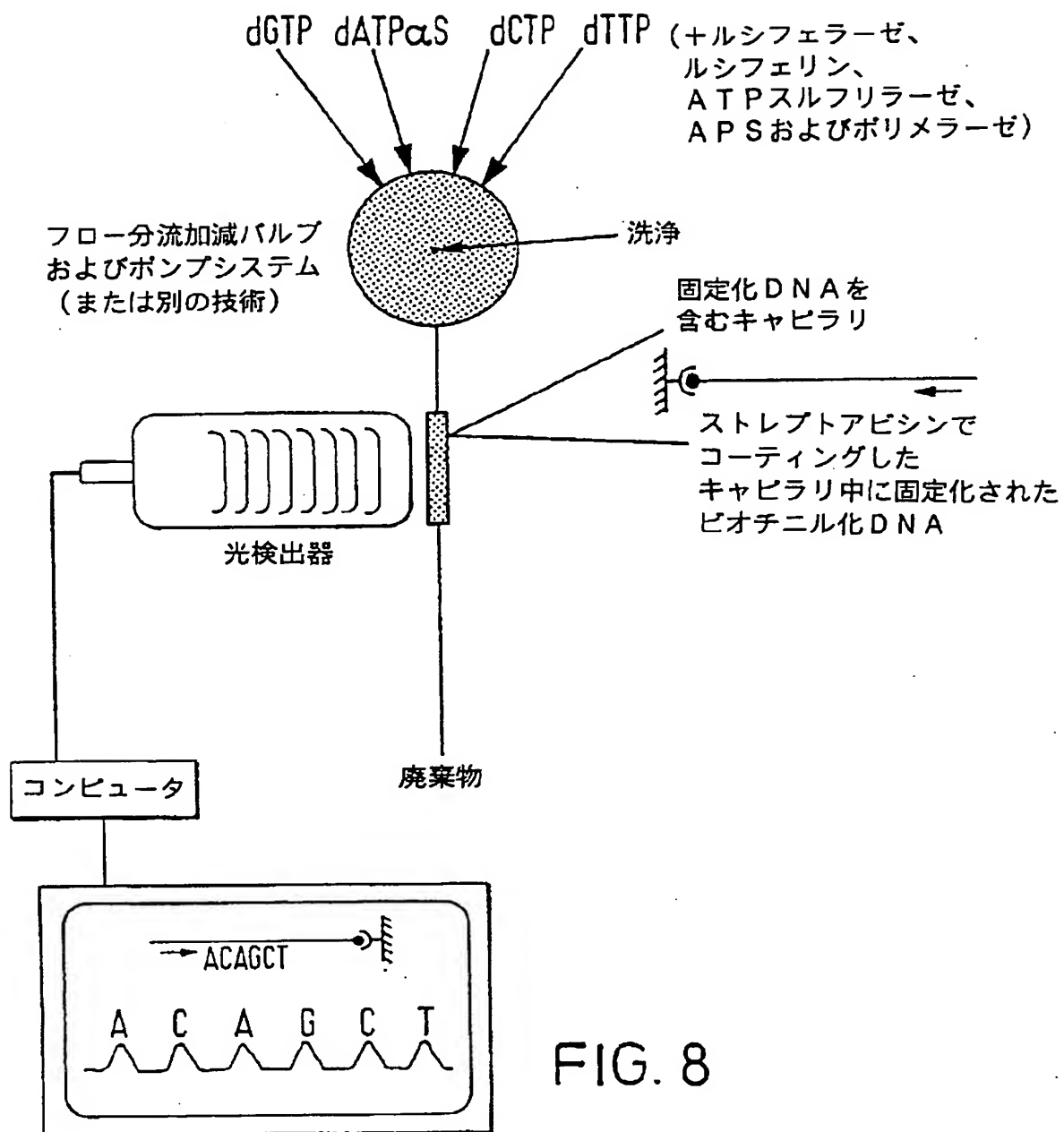


FIG. 8

## 【手続補正書】

【提出日】平成11年5月21日（1999. 5. 21）

## 【補正内容】

## 請求の範囲

1. 一本鎖試料DNA配列中の標的位置の塩基を同定する方法であって、  
標的位置にすぐ隣接して試料DNAにハイブリダイズする伸長プライマーを用意し、試料DNAおよび伸長プライマーを、デオキシヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドの存在下でポリメラーゼ反応に供し、  
それによりデオキシヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドを、それが標的位置の塩基と相補的である場合にのみ取り込まれてピロホスフェート（PPi）を放出するようにし、PPiの放出を酵素的に検出し、異なるデオキシヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドを、試料-プライマー混合物の別個のアリコートに、または同じ試料-プライマー混合物のアリコートに連続的に、添加して、ポリメラーゼ反応に供し、どのデオキシヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドが取り込まれたかを示す方法であって、PPi検出酵素がポリメラーゼ反応工程に包含されること、およびデオキシまたはジデオキシアデノシントリホスフェート（ATP）の代わりに、ポリメラーゼの基質としては作用することができるが、前記PPi検出酵素の基質としては作用することができないdATPまたはddATPアナログを用いることを特徴とする方法。
2. PPiの放出を、ルシフェラーゼ-ルシフェリンベースの反応を手段として検出する、請求項1記載の方法。
3. PPiの放出を、酵素的発光計測無機ピロホスフェート検出アッセイ（ELIDA）を用いて検出する、請求項2記載の方法。
4. dATPまたはddATPアナログが、デオキシアデノシン $\alpha$ -チオトリホスフェート（dATP $\alpha$ S）である、請求項1～3のいずれか1項記載の方法。
5. dCTP、dGTPおよびdTTPの $\alpha$ -チオアナログの使用をさらに含む、請求項1～4のいずれか1項記載の方法。

6. 試料DNAを、固定化する、または固体支持体への付着のための手段とともに提供する、請求項1～5のいずれか1項記載の方法。
7. 試料DNAを最初に増幅する、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。
8. 伸長プライマーが、ループを含み、それ自身および試料DNAの3'末端にアニーリングする、請求項1～7のいずれか1項記載の方法。
9. 試料DNAを増幅に供し；増幅されたDNAを固定化し、次に鎖分離に供し、固定化されていない鎖を除去し、標的位置にすぐ隣接して固定化DNAにハイブリダイズする伸長プライマーを用意し；固定化一本鎖DNAの4つのアリコートの各々を、次にジデオキシヌクレオチドの存在下でポリメラーゼ反応に供し、各アリコートには異なるジデオキシヌクレオチドを用いて、それにより標的位置の塩基に相補的なジデオキシヌクレオチドのみが取り込まれるようにし；次に、4つのアリコートを4つすべてのデオキシヌクレオチドの存在下で伸長に供し、それにより各アリコートにおいてジデオキシヌクレオチドと反応していないDNAを伸長させて二本鎖DNAを形成させる一方で、ジデオキシでブロックされたDNAを一本鎖DNAのまま残し；続いて、二本鎖DNAおよび／または一本鎖DNAを同定して、どのジデオキシヌクレオチドが取り込まれたか、したがってどの塩基が標的位置位置に存在したかを示す、請求項1～8のいずれか1項記載の方法。
10. ポリメラーゼ反応工程中のポリメラーゼが、エキソヌクレアーゼ欠損性（exo<sup>-</sup>）である、請求項1～9のいずれか1項記載の方法。
11. 複数の試料DNA配列についての使用のための、前記DNA配列を固体表面にアッセイフォーマットで配置する、請求項1～10のいずれか1項記載の方法。
12. 請求項1～11のいずれか1項記載の方法において用いるためのキットであって、
- (a) ポリメラーゼ；
  - (b) ピロホスフエート放出を同定するための検出酵素；および



(c) dATPの代わりに、ポリメラーゼの基質として作用することができ  
るが前記PPi検出酵素の基質として作用することはできないdAT  
Pアナログを包含する、デオキシヌクレオチド  
を含むキット。

13. さらに、

(a) 標的位置がプライマーの3'末端に直接隣接するように試料DNA  
にハイブリダイズする試験特異的プライマー；および

(d) ddATPが、ポリメラーゼの基質として作用することができるが  
前記PPi検出酵素の基質として作用することができないddAT  
Pアナログで置換されている、ジデオキシヌクレオチド  
の一方または両方を含む、請求項12記載のキット。

14. 最初のPCR増幅について用いるために、さらに

(i) 少なくとも1つのプライマーがプライマーの固定化を可能にする  
手段を有する1対のPCRプライマー；

(ii) PCR用ポリメラーゼ；および

(iii) デオキシヌクレオチド

を含む、請求項12または13記載のキット。

15. ポリメラーゼが、エキソヌクレアーゼ欠損性 (exo-) である、請求項1  
2～14のいずれか1項記載のキット。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/GB 97/02631

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 C12Q1/68 C12Q1/66		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	RONAHGI M ET AL: "Real-time sequencing using detection of pyrophosphate" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 242, November 1996, pages 84-89, XP002055379 see the whole document	1-13
A	EP 0 663 447 A (EIKEN CHEMICAL ; TANABE SEIYAKU CO (JP)) 19 July 1995 see page 13, line 7 - line 50	1-6
A	WO 93 23562 A (CEMU BIOTEKNIK AB ; UHLEN MATHIAS (SE); LUNDEBERG JOAKIM (SE)) 25 November 1993 see the whole document	1-13
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
11 February 1998		25/02/1998
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 551 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Osborne, H

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inventor's Name  
PCT/GB 97/02631

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 93 23564 A (CEMUBIOTEKNIK AB ; UHLEN MATHIAS (SE); NYREN PAAL (SE)) 25 November 1993 cited in the application see the whole document ---	1-13
A	WO 93 23563 A (CEMU BIOTEKNIK AB ; UHLEN MATHIAS (SE); PETTERSSON BERTIL (SE)) 25 November 1993 see the whole document -----	1-8

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Int. Application No  
PCT/GB 97/02631

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0663447 A	19-07-95	JP 7231799 A	05-09-95
WO 9323562 A	25-11-93	AT 147794 T	15-02-97
		AU 669365 B	06-06-96
		AU 4068193 A	13-12-93
		CA 2135607 A	25-11-93
		DE 69307503 D	27-02-97
		DE 69307503 T	10-07-97
		EP 0641390 A	08-03-95
		JP 8500724 T	30-01-96
		US 5534424 A	09-07-96
WO 9323564 A	25-11-93	AU 4068393 A	13-12-93
WO 9323563 A	25-11-93	AU 4068293 A	13-12-93
		CA 2135606 A	25-11-93
		EP 0641391 A	08-03-95
		JP 8500725 T	30-01-96

## フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW

(72)発明者 ロナギ、モスタファ

スウェーデン国、エスー115・50・ストッ  
クホルム、ロイトナンツガータン 11・6  
ティーアール

## 【要約の続き】

ることができないdATPまたはddATPアナログを用いることを特徴とする方法を提供する。本発明の方法は、有利にも、大規模の非電気泳動的固相DNA配列決定を可能にし、それにより時間に伴う重合反応の進行の連続的決定が可能になる。